

**DÉTECTION D'ACIDES SIALIQUES**  
**— OU DE SUBSTANCES APPARENTÉES —**  
**CHEZ ENTEROMORPHA PROLIFERA (MULLER) J. AGARDH**

Marie-Hélène LAUR\* et Sigurdur JONSSON\*

**RÉSUMÉ.** — L'extrait, à l'eau de mer, de fragments de thalles vivants de *E. prolifera* présente des réactions positives aux tests : orcinol-chlorhydrique, résorcinal-périodate et thiobarbiturique-périodate, mais négative après traitement préalable à la neuraminidase active de *Vibrio cholerae*. La coloration de Hale, pour les acides sialiques, adaptée à la microscopie électronique, révèle, à la surface de la paroi cellulaire, des dépôts opaque aux électrons. Ces dépôts disparaissent ou s'atténuent si les cellules sont soumises préalablement à une digestion enzymatique par la neuraminidase. Ces résultats suggèrent donc la présence d'acides sialiques, ou de substances apparentées, chez *E. prolifera*.

**SUMMARY.** — The sea water extract of living thallus fragments of *E. prolifera* reacts positively to chlorhydric-orsinol, periodate-resorcinol and periodate-thiobarbituric tests, but negatively if treated before by active neuraminidase of *Vibrio cholerae*. The Hale strain method for sialic acids adapted to electron microscope reveals electron opaque deposits at the surface of the cell wall. When the cells were treated with active neuraminidase these deposits did not appear or were reduced. These results suggest that sialic acids are present in *E. prolifera*.

### INTRODUCTION

Les composés de l'acide sialique — sialoglycoprotéiques, sialoglycolipides — sont des constituants importants, situés surtout à la périphérie de la membrane cellulaire, où ils sont responsables des charges négatives superficielles. Très répandus dans les tissus animaux (JEANLOZ et CODINGTON, 1976) et à travers tout le règne animal, ils représenteraient dans les microsomes isolés à partir des membranes d'hépatocytes de rat 65 à 70 % de la totalité des acides sialiques cellulaires; le reste appartiendrait aux autres membranes intracellulaires, principalement mitochondriales (WARREN, 1976).

\* U.P.M.C. Laboratoire de Biologie végétale marine, 4 place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05.

Ces constituants ont été reconnus aussi dans les enveloppes et capsules bactériennes et virales. Tandis que CORRELL (1964) révèle la présence d'un sialoglycopeptide dans *Chlorella*, MAYER et coll. (1964) rapportent la présence d'acide N-glycosylneuraminique dans les hydrolysats acides de graines délipidées de soja et de luzerne. Puis ONEDERA et coll. (1964) indiquent pour 64 plantes, que leurs teneurs en acides sialiques s'échelonnent de 1 à 10 % (références rapportées par SAI-SUNG et DAIN). Enfin ROBERTS (1974) révèle que la paroi de *Chlamydomonas*, non cellulosique, a une structure de glycoprotéine cristallisée. Toutefois si la caractérisation chimique des divers acides sialiques : par chromatographies (papier, phase vapeur), par digestions enzymatiques, est maintenant très sûre, l'usage des méthodes cytochimiques doit toujours être mené avec circonspection. Aussi ne seront considérés comme positifs que des résultats concordants, obtenus après emploi de méthodes variées et complémentaires. C'est ainsi que nous avons appliqué quelques unes de ces méthodes à la recherche d'acides sialiques chez *Enteromorpha prolifera*, Chlorophycées marine.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

**Matériel et culture :** nos essais portent sur des gamétophytes à l'état stérile de l'*Enteromorpha prolifera* (Müller) J. G. Agardh, âgés de 3 mois, obtenus en cultures clonales à partir de zoospores quadriflagellées, après induction expérimentale de plantes sporophytiques (JONSSON, 1977, 1980). Ces cultures s'effectuent à 12°C, dans l'eau de mer enrichie (E.S. de PROVASOLI; PROVASOLI, 1968) sous un éclairage fluorescent blanc de quelques 60  $\mu\text{E.m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$  en photopériodes 16/8.

**Extraction :** L'extrait aqueux est préparé dans l'eau de mer à partir de 3 grammes d'algues fraîches, préalablement fragmentées. Les morceaux (0,5 mm) sont soigneusement rincés dans 600 ml d'eau de mer, sur filtres de nylon fin, (en trois fois) avant d'être mis en suspension dans 100 ml d'eau de mer fraîche agités durant 5 h. Cette solution est récupérée par filtration sur verre fritté ( $n^{\circ} 4$ ).

**Essais biochimiques :** Des fractions de cet extrait sont soumises aux tests suivants :

- orcinol-chlorhydrique (SVENNER HOLM, 1956 et suite)
- résorcinol-periodate (JOURDIAN et coll., 1971)
- thiobarbiturique-periodate (WARREN, 1959).

Des aliquotes témoins sont elles, antérieurement à tout traitement, traitées : les unes par la neuraminidase active (37°C, pH 5,5, 1 h); les autres par une neuraminidase inactivée par chauffage à 50°C durant 30 mn (neuraminidase ou N-acylneuraminique hydrolase 3.2.1.18 de *Vibrio cholerae*).

**Méthodes cytochimiques :** Les échantillons (2 à 3 mm) sont fixés (0°C, 24 à 48 h) dans une solution de glutaraldéhyde (2 %), puis lavés rapidement

par une solution d'acide acétique (0,5 N, pH = 4,5).

La coloration au fer colloïdal s'effectue alors selon la méthode de HALE, décrite par MOWRY (1958) modifiée selon GASIC et BERWICK (1963) à partir de la solution de MÜLLER (1 h, 0°C, pH = 4,5-4,6).

Les échantillons sont dédifférenciés par rinçages rapides avec la même solution acétique, puis plongés durant 20 mn dans le mélange suivant : solution à 2% de ferrocyanure dans une autre solution d'acide chlorhydrique à 2% (vol/vol). Après d'abondants rinçages dans un tampon phosphate (pH = 5,0), les fragments sont alors déshydratés, inclus à l'épon, coupés. Les coupes contrastées par l'acétate d'uranyle puis le citrate de plomb, sont ensuite observées au microscope électronique.

Des fragments témoins de cette même algue, après fixation, sont traités : les uns par la neuraminidase active, les autres par l'enzyme inactivée, antérieurement à leurs coupe et colorations, comme décrit ci-dessus.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'extrait isolé de *E. prolifera* présente des réactions positives aux trois essais biochimiques, mais négatives après digestion préalable par la neuraminidase active, laissant ainsi présumer de l'existence, dans cet extrait, de substances apparentées aux acides sialiques.

Tableau I. Mise en évidence à pH = 4,5 d'acides sialiques dans l'extrait aqueux de l'*E. prolifera*, en présence ou non de neuraminidase active ou inactivée (+ + réaction très positive; + réaction positive; - réaction négative)

Tests biochimiques	neuraminidase active	neuraminidase inactivée	sans neuraminidase
orcinol chlorhydrique	-	++	++
résorcinol-periodate		+	+
thiobarbiturique-periodate		+	+

Toutefois, il convient d'ajouter que :

- la méthode à l'orcinol chlorhydrique n'est pas spécifique des acides sialiques : certains hexoses et osamines prennent effectivement coloration (+ +) d'où contaminations possibles.
- la méthode au résorcinol-periodate caractériserait les acides sialiques libres; les acides sialiques liés n'étant pas libérés totalement par l'oxydation périodique celle-ci devrait donc être renforcée.
- la méthode au thiobarbiturique-periodate serait plus appropriée pour les acides N-glycolyls-N acétyl-neuraminiques (NGNA), moins valable pour les acides N-acétyl-neuraminiques (NANA).

L'étude cytochimique, au microscope électronique, met en évidence la présence de sialocomposés. Ceux-ci fixant le fer colloïdal, apparaissent sous forme

de dépôt noirs fins (diamètre  $\leq 1 \mu\text{m}$ ) à la périphérie de la cellule; les abondants précipités intracellulaires ne seront pas considérés ici (Fig. 1, flèches).



Fig. 1. - Coupe de la paroi cellulaire de *Enteromorpha prolifera*, colorée au fer colloïdal. Les dépôts de ferrocyanure indiquent la présence d'acides sialiques (flèches) (quelques artefacts dus à un lavage insuffisant par l'acide acétique). G : 16 500 x 3.

Fig. 2. - Coupe traitée par la neuraminidase active avant coloration au fer colloïdal : disparition pratiquement totale des sialocomposés (flèches). G : 16 500 x 3.

Fig. 3. - Coupe traitée à la neuraminidase inactivée puis colorée, comme ci-dessus. Noter la position des dépôts correspondant aux acides sialiques (flèches). G : 16 500 x 3.

Après traitement à la neuraminidase active (pH = 4,5-4,6) les précipités attribués aux acides sialiques ont pratiquement disparu (Fig. 2), alors qu'ils persistent sous un aspect différent après traitement par l'enzyme inactivée (Fig. 3, flèches). Notons ici que les lavages par l'acide acétique ont dissous les glycoprotéines.

Durant ce traitement par l'enzyme, nous avons constaté l'importance des variations de pH sur la coloration. Ainsi pour pH compris entre 1 et 2,5 une coloration au fer colloïdal persiste tout en étant atténuée. On admet alors que les substances ainsi colorées possèdent un pH très acide, inférieur à 2,5; non

touchées par la neuraminidase, elles seraient assimilées à des sulfates et aux sulfonates.

Aux pH = 2 à 3,5 les précipités seraient dûs, soit aux phosphates, soit aux acides hyaluroniques.

Donc malgré leur manque de totale spécificité, l'explication de méthodes variées conduit à des résultats cohérents, relatifs à la présence de complexes d'acides sialiques chez *Enteromorpha prolifera*.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'extrait aqueux, isolé des fragments de thalle de cette Chlorophycée, se révèle fortement inhibiteur de la reproduction (JONSSON, 1977, 1980), phénomène aussi signalé chez *Ulva mutabilis* (NILSEN et NORDBY, 1975). Dès lors il est permis de se demander s'il existe un rapport entre cette inhibition et la présence d'acides sialiques ou de certaines glycoprotéines apparentées, diffusibles chez ces algues.

#### REMERCIEMENTS

La mise à jour de ce travail fut facilitée par la contribution du personnel technique du Laboratoire de Biologie végétale marine.

#### BIBLIOGRAPHIE

- GASIC, G. et BERWICK, L., 1963 — Hale stain for sialic acid containing mucins. *J. Cell Biol.* 19 : 223.
- JEANLOZ, Riv et CODINGTON, J.F., 1976 — Biological role of sialic acid to cellular surface - in «Biological Roles of Sialic Acid» - ROSENBERG A. et SCHENGRUND C.L. Edit. Plenum Press, 201.
- JONSSON, S., 1977 — Contrôle expérimental de la gamétogenèse de *Enteromorpha prolifera*. Chlorophycées marine. *C. R. Acad. Sc. Paris D*, 285 : 709.
- JONSSON, S., 1980 — Quelques effets de l'éclairement sur la phase post inductrice de la gamétogenèse chez *Enteromorpha prolifera*, Chlorophycée marine. *Cryptogamie, Algologie* 3 : 246.
- JOURDIAN, G.W., DEAN, L. et ROSEMAN, S., 1971 — The sialic acids XI A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J. Biol. Chem.* 246, n° 2 : 430.
- MOWRY, R.W., 1958 — *Lab. Invest.* 7 : 566.
- NILSEN, G. et NORDBY, Ø., 1975 — A sporulating-inhibiting substance from vegetative thalli of green alga : *Ulva mutabilis*, Foy. *Planta* (Ber) 125 : 127.
- PROVASOLI, L., 1968 — Media and prospects for cultivation of marine algae. *Proc. U.S. Jap. conf. Hakone*, 7 : 1966.
- ROBERTS, K., 1974 — Crystalline glycoproteine cell walls of Algae : their structure, composition and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 268 : 129.
- SAI-SUNG, Ng et DAIN, J.A., 1976 — Natural occurrence of sialic acids. In «Biological Roles of Sialic acids», A. ROSENBERG et C.L. SCHENGRUND Edit., Plenum Press, 103.
- SVENNERHOLM, L., 1956 — On the isolation and characterization of N-acetylsialic acid.

*Acta Soc. Med. Upsalen* 61 : 75.

- SVENNERHOLM, L., 1957 a — Quantitative estimation of sialic acid method. I. Colorimetric method with orcinol-hydrochloric acid (Biol's). *Arkiv. Kemi*, 10 : 577.
- SVENNERHOLM, L., 1957 b — II. Colorimetric resorcinol hydrochloric acid method. *Biochim. Biophys. Acta* 24 : 604.
- SVENNERHOLM, L., 1957 c — III. An anionic exchange resin method. *Acta chem. Scand.* 12 : 547.
- SVENNERHOLM, L., 1963 a — Sialic acids and derivatives : Preparation. *Methods Enzymol.* 6 : 453.
- WARREN, L., 1959 — The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* 234, n° 8, : 1971.
- WARREN, L., 1976 — The distribution of sialic acids within the eucaryotic cell. In «Biological Roles of Sialic Acids». A. ROSENBERG et C.L. SCHENGRUND Edit. Plenum Press, 103.